

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

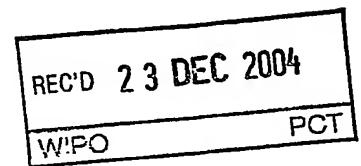
05.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 9 1 1 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 9 1 1 4]



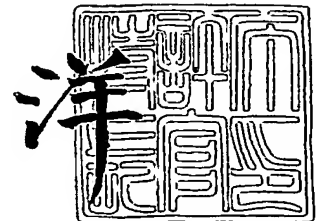
出 願 人 花王株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P05031511
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 1/00
C12N 15/00

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
【氏名】 東畑 正敏

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
【氏名】 澤田 和久

【発明者】
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内
【氏名】 尾崎 克也

【発明者】
【住所又は居所】 長野県上田市常田 3 - 1 5 - 1 信州大学繊維学部内
【氏名】 関口 順一

【特許出願人】
【識別番号】 000000918
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】
【識別番号】 110000084
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所
【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100068700
【弁理士】
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】
【識別番号】 100077562
【弁理士】
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】
【識別番号】 100096736
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】
【識別番号】 100101317
【弁理士】
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】
【識別番号】 100117156
【弁理士】
【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】
【識別番号】 100111028
【弁理士】
【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】

164232

【納付金額】

21,000円

【その他】

国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成14年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構、生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）

【提出物件の目録】

【物件名】

特許請求の範囲 1

【物件名】

明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

マルトースの膜透過に関与する遺伝子の 1 以上が削除又は不活性化された微生物に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【請求項 2】

マルトースの膜透過に関与する遺伝子が枯草菌の glvR、glvC、又は当該遺伝子に相当する遺伝子である請求項 1 記載の組換え微生物。

【請求項 3】

微生物が枯草菌又はその他のバチルス属細菌である請求項 1 又は 2 記載の組換え微生物。

【請求項 4】

異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子上流に転写開始制御領域、翻訳開始制御領域、又は分泌用シグナル領域を結合した請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の組換え微生物。

【請求項 5】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、バチルス属細菌のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子上流 0.6～1 kb 領域に由来するものである請求項 4 記載の組換え微生物。

【請求項 6】

転写開始制御領域、翻訳開始制御領域又は分泌シグナル領域が、配列番号 1 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1～659 の塩基配列、配列番号 3 で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号 1～696 の塩基配列又は当該塩基配列のいずれかと 70% 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA 断片、又は当該塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなる DNA 断片である請求項 4 記載の組換え微生物。

【請求項 7】

請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の組換え微生物をマルトースを含む培地中で培養することを特徴とするタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】組換え微生物

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産に用いる組換え微生物、及びタンパク質又はポリペプチドの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。特に最近では、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な生産菌の育種が行われるようになっており、遺伝子組換えのための宿主微生物の開発が進められている。例えば、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Marburg No.168系統株の様に宿主微生物として安全かつ優良と認められた微生物菌株に更に改良を加えた菌株が開発されている。

【0004】

しかしながら、微生物は元来、自然界における環境変化に対応するための多種多様な遺伝子群を有しており、限定された生産培地が使用されるタンパク質等の工業的生産においては、必ずしも効率的であるとは言えない状況であった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物を見出し、これにタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、微生物ゲノム上にコードされる各種遺伝子において、有用なタンパク質又はポリペプチドの生産にとって不要或いは有害な働きをする遺伝子群を鋭意探索したところ、驚くべきことに、培地の主炭素源として用いたマルトースの膜透過に参与する特定の遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子をゲノム上から削除又は不活性化した後、目的のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して目的のタンパク質又はポリペプチドを生産した場合に、その生産性が削除又は不活性化前と比較して向上することを見出した。

【0007】

すなわち本発明は、マルトースの膜透過に参与する1以上の遺伝子、特に`glvR`又は`glvC`のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子のいずれか1以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物、当該組換え微生物を用いたタンパク質又はポリペプチドの製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明の組換え微生物を用いれば、目的タンパク質又はポリペプチドを効率よく大量生産することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明において、アミノ酸配列および塩基配列の同一性は、Lipman-Pearson法 (Science, 227, 1435, (1985))によって計算される。より具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

【0010】

本発明の微生物を構築するための親微生物としては、マルトースの膜透過に関与する遺伝子、具体的には表1に示す枯草菌の遺伝子又は当該遺伝子に相当する遺伝子を有するものであればよいが、マルトースやマルトオリゴ糖を主炭素源とする培地を用いて培養を行う場合には、当該遺伝子が関与しない別のマルトース透過系を持つ微生物が望ましい。これらは、野生型のものでも変異を施したものでもよい。具体的には、枯草菌などのバチルス (*Bacillus*) 属細菌や、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、或いは酵母等が挙げられ、中でもバチルス属細菌が好ましい。更に、全ゲノム情報が明らかにされ、遺伝子工学、ゲノム工学技術が確立されている点、またタンパク質と菌体外に分泌生産させる能力を有する点から特に枯草菌が好ましい。

【0011】

本発明の微生物を用いて生産する目的タンパク質又はポリペプチドとしては、例えば食品用、医薬品用、化粧品用、洗浄剤用、繊維処理用、医療検査薬用等として有用な酵素や生理活性因子等のタンパク質やポリペプチドが挙げられる。

【0012】

本発明において削除、又は不活性の対象となる遺伝子群は、マルトースの膜透過に関与する遺伝子であり、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか又は当該遺伝子に相当する遺伝子の中から選択されるものである。

【0013】

尚、表中の各遺伝子の名称、番号、及び機能等は、Nature, 390, 249-256, (1997) で報告され、JAFAN: Japan Functional Analysis Network for *Bacillus subtilis* (BSORF DB) でインターネット公開 (<http://bacillus.genome.ad.jp/>、2003年6月17日更新) された枯草菌ゲノムデータに基づいて記載している。

【0014】

【表1】

遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子機能等
<i>glvC</i>	BG11848	PTSマルトース特異的酵素IICB
<i>glvR</i>	BG11847	<i>glvARC</i> オペロンの活性化制御因子

【0015】

また、表1に示される枯草菌の各遺伝子と同じ機能を有する、又は、表1の各遺伝子と塩基配列において70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する、他の微生物由来、好ましくはバチルス属細菌の由来の遺伝子は、表1に記載の遺伝子に相当する遺伝子と考えられ、本発明において削除、不活性化すべき遺伝子に含まれる。

【0016】

斯かる遺伝子は、培地中のマルトースを細胞内に取り込む際の膜透過に関与する、いわゆるフォスフォエノールピルビン酸依存糖フォスフォトランスフェラーゼシステム (PTS, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 4, 37, (2002)) に関する遺伝子である。より詳しくは、PTSのマルトース特異的透過酵素IICBをコードする*glvC*遺伝子、及び*glvC*遺伝子を含む*glv*オペロンの正の制御因子をコードする*glvR*遺伝子、又はこれらに該当する遺

伝子である。これらの遺伝子のいずれかを削除又は不活性化することによって、細胞のマルトース膜透過能が低下することが予想されるが、驚くべきことに、マルトースを主炭素源とする培地を用いた酵素生産培養に於いて、当該遺伝子を削除又は不活性化させた宿主微生物を用いることにより、通常の宿主を用いる場合と比べて大幅なタンパク質生産性の向上を達成できることが、本発明者らによって初めて見出された。

また、PTSによるマルトースの細胞内への取り込みには、ptsH (BG10200)、ptsI 遺伝子 (BG10201) の関与も知られているが、これら2遺伝子を含むptsオペロンの発現に必須な制御遺伝子であるglcT遺伝子 (BG12593) を削除又は不活性化することによってもタンパク質生産性を向上させることが可能であることから、ptsH又はptsIのいずれかの削除又は不活性化も生産性向上に効果があると考えられる。

【0017】

本発明では上記の遺伝子内に他のDNA断片を挿入する、或いは当該遺伝子の転写・翻訳開始領域に変異を与える等の方法によって目的遺伝子を不活性化することによっても達成できるが、好適には、標的遺伝子を物理的に削除する方がより望ましい。また、削除又は不活性化する遺伝子は1以上であればよく、2以上の削除を組み合わせても良い。更に本発明の微生物の構築には、マルトースの膜透過関与以外の遺伝子群の削除又は不活性化を組み合わせることも可能であり、生産性向上に対してより大きな効果が期待される。

【0018】

遺伝子群の削除又は不活性化の手順としては、表1に示した標的遺伝子を計画的に削除又は不活性化する方法のほか、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化変異を与えた後、適当な方法によりタンパク質生産性の評価及び遺伝子解析を行うことによっても、目的遺伝子群の削除又は不活性化することができる。

【0019】

標的遺伝子を削除又は不活性化は、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、標的遺伝子の一部を含むDNA断片を適当なプラスミドにクローニングして得られる環状の組換えプラスミドを親微生物細胞内に取り込ませ、標的遺伝子の一部領域に於ける相同組換えによって親微生物ゲノム上の標的遺伝子を分断して不活性化することが可能である。或いは、塩基置換や塩基挿入等によって不活性化変異を導入した標的遺伝子、又は標的遺伝子の外側領域を含むが標的遺伝子を含まない直鎖状のDNA断片等をPCR等の方法によって構築し、これを親微生物細胞内に取り込ませて親微生物ゲノムの標的遺伝子変異部位の外側2ヶ所領域、又は標的遺伝子外側2ヶ所の領域で2回交差の相同組換えを起こさせることにより、ゲノム上の標的遺伝子を削除或いは不活性化した遺伝子断片と置換することによっても可能である。

【0020】

特に、本発明微生物を構築するための親微生物として枯草菌を用いる場合、相同組換えにより標的遺伝子を削除又は不活性化する方法については、既にいくつかの報告例があり (Mol. Gen. Genet., 223, 268 (1990)等)、こうした方法を繰り返すことによって、本発明の宿主微生物を得ることができる。

【0021】

また、ランダムな遺伝子の削除又は不活性化についてもランダムにクローニングしたDNA断片を用いて上述の方法と同様な相同組換えを起こさせる方法や、親微生物に γ 線等を照射すること等によっても実施可能である。

【0022】

以下、より具体的にSOE (splicing by overlap extension) - PCR法 (Gene, 77, 61, (1989)) によって調製される削除用DNA断片を用いた二重交差法による削除方法について説明するが、本発明に於ける遺伝子削除方法は下記に限定されるものではない。

【0023】

本方法で用いる削除用DNA断片は、削除対象遺伝子上流に隣接する約0.2~3 kb断片と、同じく下流に隣接する約0.2~3 kb断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子断片を挿入した断片である。まず、1回目のPCRによって、削除対象遺伝子上流断片

及び下流断片、並びに薬剤耐性マーカー遺伝子断片の3断片を調製するが、この際、例えば、上流断片の下流末端に薬剤耐性マーカー遺伝子の上流側10～30塩基対配列、逆に下流断片の上流末端には薬剤耐性マーカー遺伝子の下流側10～30塩基対配列が付加される様にデザインしたプライマーを用いる(図1)。

【0024】

次いで、1回目に調製した3種類のPCR断片を鋳型とし、上流断片の上流側プライマーと下流断片の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行うことによって、上流断片の下流末端及び下流断片の上流末端に付加した薬剤耐性マーカー遺伝子配列に於いて、薬剤耐性マーカー遺伝子断片とのアニーリングが生じ、PCR増幅の結果、上流側断片と下流側断片の間に、薬剤耐性マーカー遺伝子が挿入したDNA断片を得ることができる(図1)。

【0025】

薬剤耐性マーカー遺伝子として、クロラムフェニコール耐性遺伝子を用いる場合、例えば表2に示したプライマーセットと適当な鋳型DNAを用い、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造)などの一般のPCR用酵素キット等を用いて、成書(PCR Protocols. Current Methods and Applications, Edited by B.A.White, Humana Press, pp251 (1993)、Gene, 77, 61, (1989)等)に示される通常の条件によりSOE-PCRを行うことによって、各遺伝子の削除用DNA断片が得られる。

【0026】

かくして得られた削除用DNA断片を、コンピテント法等によって細胞内に導入すると、同一性のある削除対象遺伝子の上流及び下流の相同領域において、細胞内での遺伝子組換えが生じ、目標遺伝子が薬剤耐性遺伝子と置換した細胞を薬剤耐性マーカーによる選択によって分離することができる(図1)。即ち、表2に示したプライマーセットを用いて調製した削除用DNA断片を導入した場合、クロラムフェニコールを含む寒天培地上に生育するコロニーを分離し、目的の遺伝子が削除されてクロラムフェニコール耐性遺伝子と置換していることを、ゲノムを鋳型としたPCR法などによって確認すれば良い。

【0027】

次に、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株に、目的とするタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入することによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。

【0028】

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素(Oxidoreductase)、転移酵素(Transferase)、加水分解酵素(Hydrolase)、脱離酵素(Lyase)、異性化酵素(Isomerase)、合成酵素(Ligase/Synthetase)等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 α -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類(Biochem. J., 280, 309 (1991))中でファミリー5に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号2又は4で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリセルラーゼや、当該アミノ酸配列の1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するアルカリセルラーゼが挙げられ、さらには、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるセルラーゼが挙げられる。同一性

【0029】

また、 α -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の α -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等

が挙げられる。

【0030】

また、目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、その上流に当該遺伝子の転写、翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、プロモーターおよび転写開始点を含む転写開始制御領域、リボソーム結合部位および開始コドンを含む翻訳開始領域、又、分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス属細菌由来、すなわちKSM-S237株(FERM BP-7875)、KSM-64株(FERM BP-2886)由来のセルラーゼ遺伝子と当該セルラーゼ遺伝子由来の転写開始制御領域、翻訳開始領域、分泌用シグナルペプチド領域、より具体的には配列番号1で示される塩基配列の塩基番号1～659の塩基配列、配列番号3で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号1～696の塩基配列、また当該塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片が、目的タンパク質又はポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。

【0031】

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含むDNA断片と適当なプラスミドベクターを結合させた組換えプラスミドを、一般的な形質転換法によって宿主微生物細胞に取り込ませることによって、本発明の組換え微生物を得ることができる。また、当該DNA断片に宿主微生物ゲノムとの適当な相同領域を結合したDNA断片を用い、宿主微生物ゲノムに直接組み込むことによって本発明の組換え微生物を得ることができる。

【0032】

本発明の組換え微生物を用いた目的タンパク質又はポリペプチドの生産は、当該菌株を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。培地の成分・組成などは特に限定されないが、好ましくは、炭素源としてマルトース又はマルトオリゴ糖を含む培地を用いれば、より良い結果が得られる。

【0033】

以上より、表1に示される枯草菌の遺伝子のいずれか、又は当該遺伝子に相当する遺伝子から選ばれた1以上の遺伝子が削除又は不活性化された宿主微生物変異株、及び当該変異株を用いて組換え微生物を構築することができ、これを用いれば有用なタンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。

【0034】

以下に、枯草菌のglvC遺伝子(BG11848)あるいは、glvR遺伝子(BG11847)を削除した組換え枯草菌株構築の実施例と当該組換え微生物を用いたセルラーゼ又は α -アミラーゼの生産方法について具体的に説明する。

【実施例】

【0035】

実施例1

枯草菌168株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、表2に示したglvC-AFとglvC-A/CmR、及びglvC-B/CmFとglvC-BRの各プライマーセットを用いて、ゲノム上のglvC遺伝子の上流に隣接する0.5kb断片(A)、及び下流に隣接する0.5kb断片(B)をそれぞれ調製した。一方、プラスミドpC194(J. Bacteriol. 150(2), 815(1982))を鋳型とし、表2に示したglvC-A/CmFとglvC-B/CmRプライマーセットを用いて、クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む0.9kb断片(C)を調製した。次に、得られた(A)(B)(C)3断片を混合して鋳型とし、表2のプライマーglvC-AFとglvC-BRを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を(A)(C)(B)の順になる様に結合させ、1.9kbのDNA断片を得た(図1参照)。このDNA断片を用いてコンピテント法により枯草菌168株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育した

コロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体のゲノムを抽出し、PCRによってglvC遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換していることを確認した。

【0036】

【表2】

プライマー	塩基配列	配列番号
glvC-AF	AAATGCGCAAAAGATATGCGC	5
glvC-A/CmR	CTAATGGGTGCTTTAGTTGCTGATACCGACGATAATGCC	6
glvC-B/CmF	CTGCCCCGTTAGTTGAAGAGACTGCCCTCCTTTTCGG	7
glvC-BR	CGCAAATCATAAAAAATCATATTT	8
glvC-A/CmF	CAACTAAAGCACCCATTAGTTCAACA	9
glvC-B/CmR	CTTCAACTAACGGGGCAGGTTAGTGAC	10
glvR-AF	CAGATGATATGGTGAAAAAATCAAATCCG	11
glvR-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGAGCTGCATATCAGATCCC	12
glvR-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACTGTTGATTACAAAGAGGCAG	13
glvR-BR	CCATCGGCCAAATATAAGACACAGCCAACGC	14
glvR-A/CmF	GAATTGTGAGCGGATAAC	15
glvR-B/CmR	GTTTCCCAGTCACGACG	16
glcT-AF	ATAATGCCCGCTTCCCAACC	17
glcT-A/CmR	GTTATCCGCTCACAATTCGATCCTCAGTCCTTTGTC	18
glcT-B/CmF	CGTCGTGACTGGGAAAACTCATCTGATACCGATTAACC	19
glcT-BR	CAACTGAATCCGAAGGAATG	20

【0037】

実施例 2

実施例 1 と同様、表 2 に示したglvR-AFとglvR-A/CmR、及びglvR-B/CmFとglvR-BRの各プライマーセットを用いて、ゲノム上のglvR遺伝子上流に隣接する0.6 kb断片(A)、及び下流に隣接する0.6 kb断片(B)をそれぞれ調製した。一方、プラスミドpC194 (J. Bacteriol. 150 (2), 815 (1982)) のクロラムフェニコール耐性遺伝子をプラスミドpUC18のXbaI-BamHI切断点に挿入した組換えプラスミドpCBB31を鋳型とし、表 2 に示したプライマーセットglvR-A/CmF及びglvR-B/CmRを用いてクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む0.9 kb断片(C)を調製した。次に、得られた(A)(B)(C)3断片を混合して鋳型とし、表 2 のプライマーglvR-AFとglvR-BRを用いたSOE-PCRを行うことによって、3断片を(A)(C)(B)の順になる様に結合させ、2.2 kbのDNA断片を得た(図1参照)。このDNA断片を用いてコンピテント法により枯草菌168株の形質転換を行い、クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に生育したコロニーを形質転換体として分離した。得られた形質転換体のゲノムを抽出し、PCRによってglvR遺伝子が削除され、クロラムフェニコール耐性遺伝子に置換していることを確認した。また、同様にglcT-AFとglcT-A/CmR、及びglcT-B/CmFとglcT-BRの各プライマーセットを用いて、glcT遺伝子が削除されてクロラムフェニコールに置換した形質転換体を分離した。

【0038】

実施例 3

実施例 1、2 にて得られた各遺伝子削除株、及び対照として枯草菌 168 株に、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237 株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子 (特開 2000-210081 号公報、配列番号 1) 断片 (3.1 kb) がシャトルベクター pHY300 PLK の BamHI 制限酵素切断点に挿入された組換えプラスミド pHY-S237 を、プロトプラスト形質転換法によって導入した。これによって得られた菌株を 5 mL の LB 培地で一夜 30℃ で振盪培養を行い、更にこの培養液 0.03 mL を 30 mL の 2×L マルトース培地 (2% トリプトン、1% 酵母エキス、1% NaCl、7.5% マルトース、7.5 ppm 硫酸マンガン 4-5 水和物、15 ppm テトラサイクリン) に接種し、30℃ で 3 日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表 3 に示した様に、孢子形成遺伝子削除株を用いた場合はいずれも、対照の 168 株 (野生型) の場合と比較してアルカリセルラーゼの高い分泌生産が認められた。

【0039】

【表 3】

削除遺伝子名	遺伝子番号	遺伝子サイズ (bp)	削除サイズ (bp)	アルカリセルラーゼ 分泌生産量 (相対値)
<i>glvC</i>	BG11848	1584	1498	161
<i>glvR</i>	BG11847	715	765	140
<i>glcT</i>	BG12593	858	811	110
なし (野生型)	—	—	—	100

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図 1】 SOE-PCR による遺伝子削除用 DNA 断片の調製、及び当該 DNA 断片を用いて標的遺伝子を削除 (薬剤耐性遺伝子と置換) する方法を模式的に示したものである。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> KAO CORPORATION

<120> Host microorganisms

<130> P05031511

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

<213> Bacillus sp. KSM-S237

<220>

<221> CDS

<222> (573)..(3044)

<223>

<220>

<221> sig_peptide

<222> (573)..(659)

<223>

<220>

<221> mat_peptide

<222> (660)..()

<223>

<400> 1

gatttgcga tgcaacaggc ttatathtag aggaaatttc tttttaaatt gaatacggaa 60

taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat ttttttgagt tttttagaga actgaagatt 120

gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180

gcctttttat aattatttat acctagaacg aaaatactgt ttcgaaagcg gtttactata 240

aaaccttata ttccggctct tttttaaaac agggggtaaa aattcactct agtattctaa 300

tttcaacatg ctataataaa ttigtgaagac gcaatatgca tctctttttt tacgatatat 360

gtaagcgggtt aaccttgtgc tatatgccga tttaggaagg ggggtagatt gagtcaagta 420

gtaataatat agataactta taagttgttg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca 480

agttttttta aaactttaac gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga 540
 ttcaattact ttaaaaatat ttaggaggta at atg atg tta aga aag aaa aca 593
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr
 -25
 aag cag ttg att tct tcc att ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta 641
 Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu
 -20 -15 -10
 ttt ccg gca gct ctt gca gca gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt 689
 Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe
 -5 -1 1 5 10
 aaa cat tta tta ggt aat gac aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc 737
 Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly
 15 20 25
 gca tta caa tta caa gaa gtc gat gga caa atg aca tta gta gat caa 785
 Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln
 30 35 40
 cat gga gaa aaa att caa tta cgt gga atg agt aca cac gga tta cag 833
 His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln
 45 50 55
 tgg ttt cct gag atc ttg aat gat aac gca tac aaa gct ctt tct aac 881
 Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn
 60 65 70
 gat tgg gat tcc aat atg att cgt ctt gct atg tat gta ggt gaa aat 929
 Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn
 75 80 85 90
 ggg tac gct aca aac cct gag tta atc aaa caa aga gtg att gat gga 977
 Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly
 95 100 105
 att gag tta gcg att gaa aat gac atg tat gtt att gtt gac tgg cat 1025
 Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His
 110 115 120
 gtt cat gcg cca ggt gat cct aga gat cct gtt tat gca ggt gct aaa 1073
 Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys
 125 130 135
 gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att 1121
 Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile
 140 145 150

att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat aat ggt gga gca 1169
 Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala
 155 160 165 170

ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct 1217
 Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala
 175 180 185

gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac 1265
 Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn
 190 195 200

att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca 1313
 Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala
 205 210 215

gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc 1361
 Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe
 220 225 230

tac act ggt tca cat gct gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act 1409
 Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr
 235 240 245 250

cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta 1457
 Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu
 255 260 265

gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct 1505
 Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala
 270 275 280

agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa 1553
 Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu
 285 290 295

ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat 1601
 Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn
 300 305 310

aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct 1649
 Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser
 315 320 325 330

aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa 1697
 Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu
 335 340 345

gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg 1745

Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val
 350 355 360
 aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac 1793
 Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp
 365 370 375
 ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca 1841
 Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro
 380 385 390
 aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt 1889
 Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val
 395 400 405 410
 tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct 1937
 Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala
 415 420 425
 aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta 1985
 Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu
 430 435 440
 ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg 2033
 Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr
 445 450 455
 gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat 2081
 Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn
 460 465 470
 cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg 2129
 Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr
 475 480 485 490
 gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct 2177
 Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro
 495 500 505
 aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac 2225
 Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn
 510 515 520
 atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat 2273
 Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp
 525 530 535
 aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat 2321
 Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp
 540 545 550

cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt 2369
Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg
555 560 565 570

caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca 2417
Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr
575 580 585

att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat 2465
Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr
590 595 600

cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat 2513
Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp
605 610 615

ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt 2561
Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe
620 625 630

gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc 2609
Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile
635 640 645 650

aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca 2657
Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro
655 660 665

aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta 2705
Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val
670 675 680

aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca 2753
Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr
685 690 695

aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca 2801
Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala
700 705 710

gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt 2849
Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg
715 720 725 730

ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat 2897
Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp
735 740 745

cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa 2945

Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu
 750 755 760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag 2993
 Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys
 765 770 775

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa 3041
 Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys
 780 785 790

aaa taatctatta aactagttat agggttatct aaaggtctga tgtagatctt 3094
 Lys
 795

ttagataacc tttttcttgc ataactggac acagagttgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 2

<211> 824

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-S237

<400> 2

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile
 -25 -20 -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Ala Ala Leu Ala Ala Glu Gly
 -10 -5 -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val
 5 10 15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly
 20 25 30 35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly
 40 45 50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn
 55 60 65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met Ile Arg Leu

70

75

80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro Glu Leu Ile
 85 90 95

Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met
 100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp
 120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu
 135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser
 150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp
 165 170 175

Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys
 180 185 190 195

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp
 200 205 210

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His
 215 220 225

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr
 230 235 240

Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met
 245 250 255

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr
 260 265 270 275

Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp
280 285 290

Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp
295 300 305

Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr
310 315 320

Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro
325 330 335

Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val
340 345 350 355

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys
360 365 370

Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe
375 380 385

Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn
390 395 400

Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val
405 410 415

Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp
420 425 430 435

Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val
440 445 450

Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser
455 460 465

Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala

470

475

480

Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr
485 490 495

Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu
500 505 510 515

Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala
520 525 530

Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val
535 540 545

Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser
550 555 560

Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser
565 570 575

Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala
580 585 590 595

Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp
600 605 610

Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly
615 620 625

Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala
630 635 640

Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn
645 650 655

Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu
660 665 670 675

Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys
680 685 690

Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg
695 700 705

Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg
710 715 720

Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro
725 730 735

Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp
740 745 750 755

Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys
760 765 770

Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
775 780 785

Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys
790 795

<210> 3
<211> 3332
<212> DNA
<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>
<221> CDS
<222> (610)..(3075)
<223>

<220>
<221> sig_peptide
<222> (610)..(696)
<223>

<220>
<221> mat_peptide

<222> (697)..()

<223>

<400> 3

agtacttacc atttttagagt caaaagatag aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60

cttatattta gaggggaattt ctttttaaatt tgaatacggga ataaaatcag gtaaacaggt 120

cctgatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180

acggacataa gaaaattgta ttagttttta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240

tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc ggtttactat aaaaccttat attccggctc 300

tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360

atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcgggt aaccttgtgc 420

tatatgccga tttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacttat 480

aagttgttga gaagcaggag agaatctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540

aagcactttc gggtatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600

ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile
 -25 -20

ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699
 Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala
 -15 -10 -5 -1 1

gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747
 Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp
 5 10 15

aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795
 Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val
 20 25 30

gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta 843
 Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu
 35 40 45

cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat 891
 Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn
 50 55 60 65

gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att 939
 Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile

70	75	80	
cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu 85 90 95			987
tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn 100 105 110			1035
gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro 115 120 125			1083
aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala 130 135 140 145			1131
gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu 150 155 160			1179
cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu 165 170 175			1227
ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gta gaa atg tta Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu 180 185 190			1275
cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro 195 200 205			1323
aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp 210 215 220 225			1371
cac cat aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala 230 235 240			1419
tca act gaa agc tat ccg cct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn 245 250 255			1467
gta atg agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gca gta ttt Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe 260 265 270			1515

gca aca gag tgg gga act agc caa gca aat gga gat ggt ggt cct tac 1563
 Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr
 275 280 285

ttt gat gaa gca gat gta tgg att gag ttt tta aat gaa aac aac att 1611
 Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile
 290 295 300 305

agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca 1659
 Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala
 310 315 320

ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca aca agt ctt gac cca 1707
 Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro
 325 330 335

ggg cca gac caa gta tgg gta cca gaa gag tta agt ctt tct gga gaa 1755
 Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu
 340 345 350

tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt 1803
 Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg
 355 360 365

aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa 1851
 Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln
 370 375 380 385

gga ttt gga gtg aat gga gat tct cca gtt gaa gat gta gtt att gag 1899
 Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu
 390 395 400

aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat 1947
 Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp
 405 410 415

gtt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt 1995
 Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly
 420 425 430

tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat 2043
 Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp
 435 440 445

gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa 2091
 Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln
 450 455 460 465

ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag 2139
 Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu

470	475	480	
cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act			2187
Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr			
485	490	495	
ata act tca gct gac tci cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct			2235
Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala			
500	505	510	
gaa aat aac aac atc aac aac atc att ctt ttt gta gga act gaa ggt			2283
Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly			
515	520	525	
gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt			2331
Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val			
530	535	540	545
gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct			2379
Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser			
550	555	560	
gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct			2427
Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser			
565	570	575	
ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg			2475
Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala			
580	585	590	
tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg			2523
Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp			
595	600	605	
gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt			2571
Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly			
610	615	620	625
gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca			2619
Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala			
630	635	640	
aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac			2667
Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn			
645	650	655	
ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa			2715
Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu			
660	665	670	

tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa 2763
 Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys
 675 680 685

att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt 2811
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg
 690 695 700 705

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2859
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg
 710 715 720

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2907
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro
 725 730 735

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat 2955
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp
 740 745 750

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 3003
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys
 755 760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala
 770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatctaata aactagttat agggttatct 3105
 Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys
 790

aaaggctctga tgcagatctt ttagataacc tttttttgca taactggaca tagaatgggtt 3165

attaaagaaa gcaagggtgtt tatacgatat taaaaaggta gcgatttttaa attgaaacct 3225

ttaataatgt cttgtgatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agtagaagaa aaacagacca agaaatactg caagctt 3332

<210> 4

<211> 822

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-64

<400> 4

Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile Leu Ile
 -25 -20 -15

Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala Glu Gly
-10 -5 -1 1

Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp Asn Val
5 10 15

Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val Asp Gly
20 25 30 35

Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu Arg Gly
40 45 50

Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn Asp Asn
55 60 65

Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile Arg Leu
70 75 80

Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu Leu Ile
85 90 95

Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn Asp Met
100 105 110 115

Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp
120 125 130

Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala Ala Leu
135 140 145

Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser
150 155 160

Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp
165 170 175

Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Asp
180 185 190 195

Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp
200 205 210

Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His
215 220 225

Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr
230 235 240

Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met
245 250 255

Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr
260 265 270 275

Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp
280 285 290

Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp
295 300 305

Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr
310 315 320

Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro Gly Pro
325 330 335

Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val
340 345 350 355

Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys
360 365 370

Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe
375 380 385

Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu Asn Glu
390 395 400

Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp Val Ser
405 410 415

Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly Trp Gly
420 425 430 435

Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile
440 445 450

Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln Gly Pro
455 460 465

Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu Pro Thr
470 475 480

Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr Ile Thr
485 490 495

Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala Glu Asn
500 505 510 515

Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly Ala Asp
520 525 530

Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile
535 540 545

Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe
550 555 560

Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val
565 570 575

Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser
580 585 590 595

Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr
600 605 610

Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn
615 620 625

Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu
630 635 640

Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr
645 650 655

Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu
660 665 670 675

Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn
680 685 690

Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met
695 700 705

Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe
710 715 720

Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu
725 730 735

Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys
740 745 750 755

Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala
760 765 770

Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Ile Lys
775 780 785

Asn Glu Ala Thr Lys Lys
790

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 5
aaatgcgcaa aagatatgcg c 21

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 6
ctaattgggtg ctttagttgc tgataccgac gataatgcc 39

<210> 7
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 7
ctgccccgtt agttgaagag actgccctcc ttttcgg 37

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 8
cgcaaactca taaaaatcat attt 24

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 9
caactaaagc acccattagt tcaaca 26

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 10
cttcaactaa cggggcaggt tagtgac 27

<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 11
cagatgatat ggtgaaaaaa tcaaattccg 29

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 12
gttatccgct cacaattccg agctgcatat cagatccc 38

<210> 13
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 13
cgctcgtgact gggaaaactg ttgattacaa agaggcag 38

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 14
ccatcggccca aatataagac acagccaacg c 31

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 15
gaattgtgag cggataac 18

<210> 16
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 16
gttttcccag tcacgacg 18

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 17
ataatgcccg cttcccaacc 20

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 18
gttatccgct cacaattccg atcctcagct cctttgtc 38

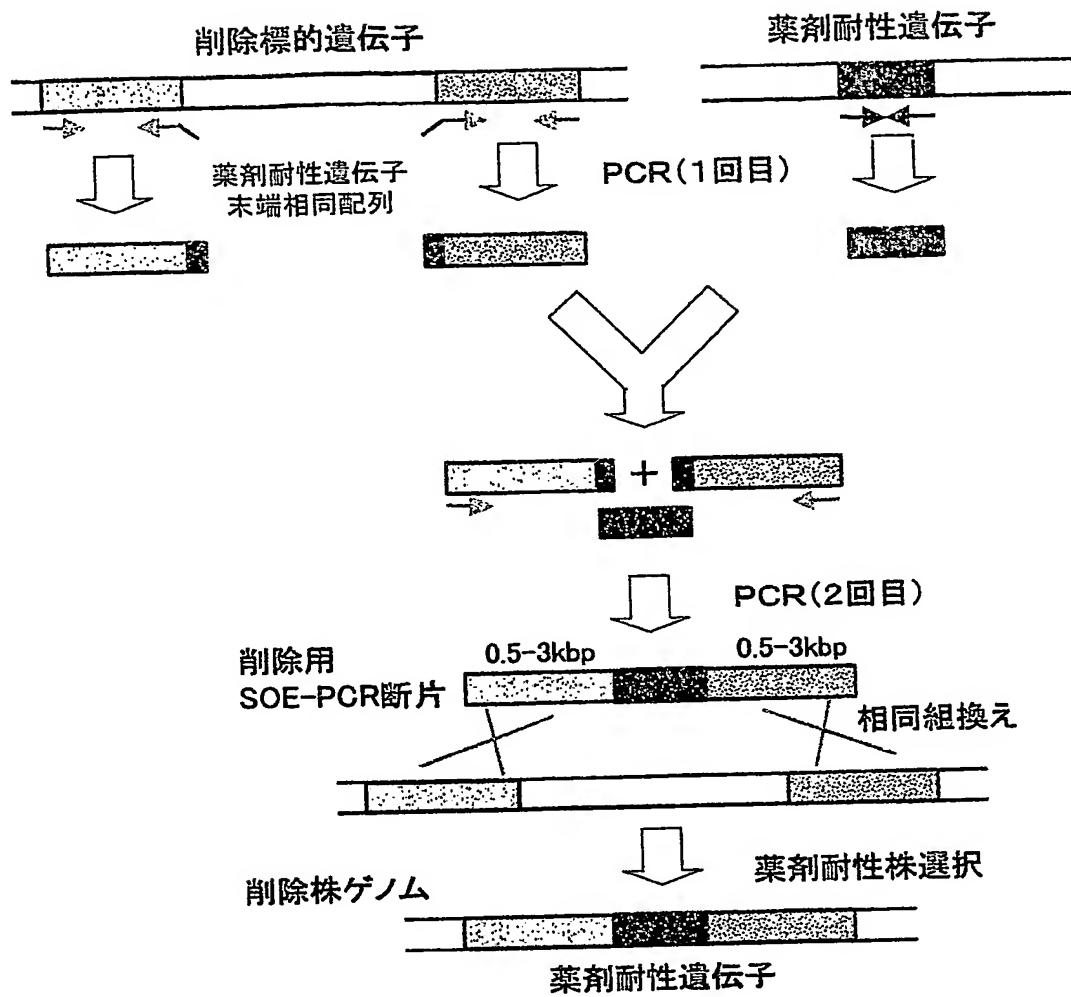
<210> 19
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 19
cgtcgtgact gggaaaactc atctgatacc gattaacc 38

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 20
caactgaatc cgaaggaatg 20

【書類名】 図面
【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質又はポリペプチドの生産性向上を可能とする宿主微生物を見出し、これにタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入して得られる組換え微生物、更に当該組換え微生物を用いるタンパク質又はポリペプチドの製造法を提供する。

【解決手段】 マルトースの膜透過に参与する 1 以上の遺伝子が削除又は不活性化された微生物変異株に、異種のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を導入した組換え微生物。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-379114
受付番号	50301850078
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成15年11月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成15年11月 7日

特願 2 0 0 3 - 3 7 9 1 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日
新規登録
東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号
花王株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.